

Blutspendezentrum Limmattal SRK, Schlieren ZH

Leitung: PD Dr. M. Frey-Wettstein

Veterinärbakteriologisches Institut der Universität Bern

Direktion: Prof. Dr. H. Fey

Arbeit unter Leitung von

PD Dr. M. Frey-Wettstein

Tetanusantikörper-Screening bei Blutspendern

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

**Ulrich Markus BERGER
von Neftenbach ZH**

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. P. Frick

ZÜRICH 1981



Publiziert in
Schweiz. med. Wschr. 111, Nr. 2 (1981)

Blutspendezentrum Limmattal
des Schweizerischen Roten Kreuzes, Schlieren,
und Veterinärbakteriologisches Institut der Universität Bern

Tetanusantikörper-Screening bei Blutspendern

U. BERGER, M. FREY-WETTSTEIN, H. FEY

Zusammenfassung. Es werden zwei ELISA-Test-Methoden für das Routinescreening auf Tetanus-Antikörper vorgestellt. Eine Reihenuntersuchung an Blutspendern zeigt, dass die Schweizer Bevölkerung recht gut gegen Tetanus immunisiert ist. Dabei weisen die Männer einen besonders guten Immunisierungsgrad auf. Ein Teil dieser Blutspender weist so hohe Tetanus-Antikörper-Titer auf, dass sich Plasmapherese-Entnahmen zur Gewinnung von hochtitrigem Anti-Tetanus-Hyperimmunglobulin durchaus lohnen würden.

Summary. Two ELISA test methods for detection of tetanus antibodies are presented which are suitable for routine screening. Administration of the tests to blood donors shows good average immunization of the Swiss population against tetanus. Due to compulsory immunization during military service, men exhibit markedly higher antibody levels against tetanus than women. Some of the tested blood donors have rather high tetanus antibody titers, and it would be worth collecting plasma from these donors by plasmapheresis for production of a high-titred antitetanus hyperimmunglobulin.

In den letzten Jahrzehnten ist die aktive Immunisierung gegen Tetanus in entwickelten Ländern zur Routine geworden. Das Tetanustoxoid hat gute immunogene Eigenschaften, und seine Verwendung bei der Vakzination erwies sich weitgehend frei von Nebenwirkungen. Aufgrund der konsequenten Prophylaxe ist die meist letal verlaufende Krankheit des Wundstarrkrampfes bei uns praktisch verschwunden. Allerdings sterben in Entwicklungsländern infolge Nabelschnurinfektionen immer noch bis 10% aller Lebendgeborenen an Tetanus neonatorum. Auch für die Zukunft besteht weiterhin ein bedeutender Bedarf an menschlichem Antitetanus-Hyperimmunglobulin zur prophylaktischen und therapeutischen Verwendung.

In der Schweiz wird heute Tetanus-Hyperimmunglobulin von frischgeimpften Rekruten gewonnen. Nach

einer Grundimmunisierung mit 2 in einmonatigem Abstand verabreichten Tetanustoxiddosen spenden diese jungen Leute Blut. Das Plasma dieser Blutspenden wird ohne Einzeltiterbestimmung gepoolt. Solche Plasmapools weisen erfahrungsgemäss einen Tetanus-Antikörper-Titer von durchschnittlich 3 IE auf [8], also einen relativ niedrigen Titer. Eine internationale Einheit (IE) entspricht 0,03384 mg des internationalen Standardglobulins [12]. Es ist bekannt, dass die Tetanus-Antikörper-Titer bei Einzelspendern sehr stark variieren [9, 10], weshalb das Poolen von Plasmen zur Gewinnung von Tetanus-Hyperimmunglobulin ohne Einzeltiterbestimmung nicht in jeder Beziehung befriedigt. Für eine gezielte Prophylaxe und Therapie wäre es wünschbar, für die Herstellung von Tetanus-Hyperimmunseren ein etwas höhertitriges Ausgangsplasma zur Verfügung zu haben.

Bei der Bestimmung von Tetanus-Antikörper-Spiegeln findet neben der Flockungsreaktion [11] meist entweder die Hämagglutination [6] oder die Immunelektrophorese [1, 5, 7] Verwendung. Die beiden letztgenannten Methoden sind semiquantitative Verfahren, die niedrigtitrige Seren schlecht erfassen. Die klassische und sehr genaue Methode zur Erfassung von Tetanus-Antitoxin ist der Tierversuch. Er misst direkt den Schutzwert der Antikörper. Die einzige an Empfindlichkeit und Spezifität dem Tierschutzversuch vergleichbare Methode ist der Radioimmunosorbent-Test (RIST) [3, 9]. Dieses Verfahren ist aber aufwendig und kommt wegen der notwendigen Radiomarkierung von Proteinen nur für ausgewählte Laboratorien in Frage.

Das Ziel dieser Arbeit ist, den ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) als eine einfache, zuverlässige Methode zur quantitativen Bestimmung des Tetanus-Antitoxin-Gehaltes gesunder Personen vorzustellen, die sich für das Routinescreening eignet. Anhand von Reihenuntersuchungen von Blutspendern wurden mit Hilfe der Impfanamnese geeignete Spender für die Gewinnung von hochtitrigem Tetanus-Hyperimmunglobulin gesucht.

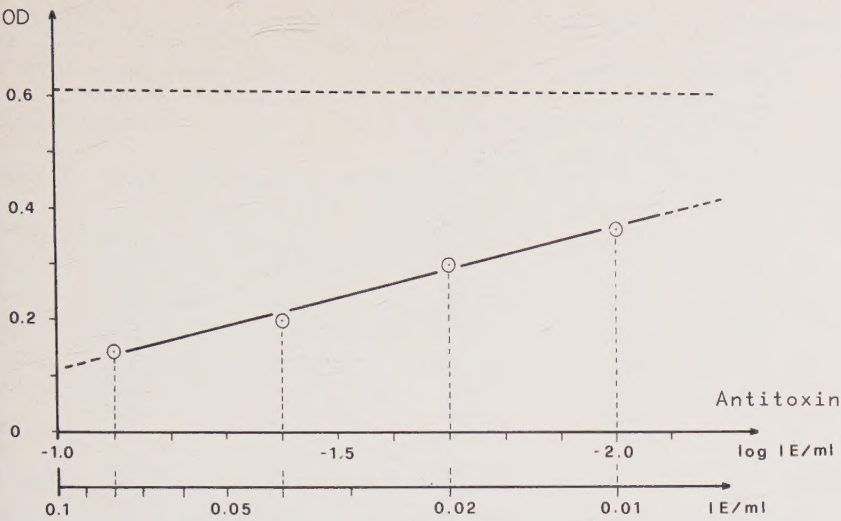
Material und Methodik

Blutspender

An 4 verschiedenen Tagen wurden bei je 50 konsekutiven Blutspendern (insgesamt 200 Personen) eine detaillierte Tetanus-Impfanamnese aufgenommen (Zeitpunkt der allfälligen Grundimmunisierung, Zahl und Zeitpunkt allfälliger Wiederimpfungen, insbesondere Datum der letzten Impfung) und eine Blutprobe abgenommen.

Testmethoden

Aus praktischen Gründen wurden für die Bestimmung des Tetanus-Antitoxin-Gehaltes 2 Testsysteme verwendet: einerseits ein einfaches Screening-Verfahren (ELISA-Protein-A-Test) zur Erfassung der hochtitrigen Seren, andererseits eine gut eingeführte quantitative Methode zur genauen Titerbestimmung (kompetitiver ELISA). Das Grundprinzip des ELISA ist einfach: Ein Enzym wird an eine an der Antigen-Antikörper-Reaktion beteiligte Komponente gebunden.



	Verdünnung	Antikörpergehalt (IE/ml)	Extinktion (OD)
Standardserum	1:200	0,08	0,148
	1:400	0,04	0,201
	1:800	0,02	0,305
	1:1600	0,01	0,365
Negatives Serum	1:100	0,00	0,610

Abb. 3. Beispiel einer Standardkurve zur Auswertung des kompetitiven ELISA.

Resultate

In Tabelle 1 sind die Resultate von 35 Proben mit messbarem Tetanus-Antikörper-Spiegel zusammengefasst. Nebst den Ergebnissen des ELISA-Protein-A-Screeningtests und der quantitativen Antikörperdoppelbestimmung im kompetitiven ELISA finden sich dabei detaillierte Angaben über die Impfanamnese. Die Resultate von 27 Proben mit einfach positivem (+) ELISA-Protein-A-Test, die aber im kompetitiven ELISA durchweg Titer von weniger als 3 aufwiesen, fehlen auf dieser Liste. Bei diesen nicht aufgeführten Spendern liegt die letzte Immunisierung 3 oder mehr Jahre zurück. Die Resultate bestätigen die von ENTWISTLE und ELDRIDGE festgestellte Korrelation zwischen Titerhöhe und zeitlichem Abstand von der letzten Immunisierung [1].

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse des ELISA-Protein-A-Screening zusammengefasst. In diesem Test stark positive (+++/++) Seren zeigen in mehr als 80% Tetanus-Antikörper-Spiegel von mehr als 5 IE, wobei in der stärksten Reaktionsstufe (+++) nur 1 von 7 Spendern einen Titer von weniger als 20 IE aufweist. Andererseits findet sich bei den 33 schwach positiven (+) Seren nur eine einzige Probe mit einem Titer von mehr als 5 IE.

In Tabelle 3 finden sich die Resultate der Tetanus-Antikörper-Bestimmungen nach Titerhöhe und Geschlecht der Blutspender geordnet. Seren mit Titern von weniger als 0,5 IE (Empfindlichkeitsgrenze des

kompetitiven ELISA bei der von uns gewählten Verdünnung) werden als tetanus-antikörper-negativ bezeichnet. Zwischen 0,5 und 5,0 IE liegende Werte entsprechen schwachtitrigen, solche zwischen 5 und 15 IE hochtitrigen, solche mit mehr als 15 IE sehr hochtitrigen Seren. Der Wert von 5 IE wird international als Mindestanforderung für die Gewinnung von Tetanus-Immunglobulin erachtet. Bei einem Drittel der untersuchten Personen konnten Antikörper gegen Tetanustoxin nachgewiesen werden, zwei Drittel wiesen zum Teil trotz positiver Impfanamnese keine messbare Immunität gegen Tetanus auf. Die getesteten Männer haben einen prozentual höheren Immunisierungsgrad und deutlich höhere Antikörpertiter als die untersuchten Frauen. Während sich bei 12% der Männer gute bis sehr gute Tetanus-Antikörper-Titer finden, trifft dies nur bei 8% der Frauen zu.

In Tabelle 4 wird die Titerhöhe der einzelnen Seren mit der Impfanamnese der Probanden in Beziehung gebracht. Alle 200 Personen wurden bezüglich Tetanus-Impfung befragt. 192 davon konnten brauchbare Angaben machen, 2 waren erst kurzfristig vor der Blutentnahme frisch geimpft worden, und 5 konnten sich nicht mit Sicherheit an frühere Impfungen zurückerinnern; 1 Spender (Nr. 27 356) zeigte angeblich bereits bei der ersten Tetanus-Impfung eine starke lokale Überempfindlichkeitsreaktion, weshalb seine Aussagen nicht eindeutig verwertbar sind. Entsprechend dem

Tabelle 1. Zusammenstellung der tetanus-antikörper-positiven Spender

Spender-Nr.	Geschlecht, Jahrgang	ELISA- Prot. A	Kompetitiver ELISA (Titer in IE)		Grund- immuni- sierung*	Anzahl Re-Immuni- sierungen	Jahre seit letzter Immunisierung
			I	II			
26 612	♂, 59	+++	46	42	keine	4	1
21 057	♂, 48	++	45	43	72 MD	1	2/12
25 790	♂, 59	+++	40	41	74	2	8/12
16 326	♂, 56	+++	35	37,5	keine	1	2/12
1 585	♂, 21	++	38	31	41 MD	1	6/12
9 504	♀, 42	+++	33,8	27,5	74	1	6/12
28 159	♂, 58	++	24,5	24,2	78 MD	0	9/12
10 174	♀, 46	+++	23,1	—	68	1	1/12
14 900	♀, 39	++	24	18,6	keine	3	3
730	♂, 45	++	23,1	20,0	65 MD	2	1
27 356**	♂, 55	+++	21,1	18,6	keine	1	11**
5 630	♂, 40	+	20,6	17,3	keine	3	1/12
19 050	♂, 56	++	19,2	18,8	77 MD	0	1
26 217	♂, 57	++	18,2	—	Kind	4	1
16 124	♂, 44	++	15,4	12,7	64 MD	1	1
3 068	♂, 52	+++	10,0	11,2	71 MD	3	3
5 112	♂, 47	++	10,0	11,9	67 MD	1	4
25 338	♂, 57	++	10,6	9,3	76 MD	0	2
21 277	♂, 38	++	8,3	9,5	59 MD	1	8/12
25 880	♀, 59	++	7,7	8,5	62	5	1
26 146	♂, 46	++	8,4	6,2	keine	2	3
5 513	♀, 53	++	7,0	7,3	Kind	4	3
13 967	♂, 34	++	6,0	5,4	MD	3	6
25 139***	♂, 57	++	6,7	3,6	KA	KA	KA
2 060	♂, 40	++	5,4	3,0	60 MD	1	14
25 983	♂, 45	++	4,5	3,0	MD	1	14
16 229	♂, 41	++	3,4	4,1	60 MD	1	18
21 943	♂, 43	++	3,2	3,5	63 MD	0	15
148	♂, 48	+	3,4	3,4	68 MD	1	10
26 005	♀, 56	++	3,0	3,5	Kind	1	2
23 067	♂, 44	+	3,5	2,3	64 MD	3	2
27 334	♀, 42	+	3,4	2,3	68	2	4
2 023	♂, 27	+	2,9	3,0	47 MD	2	2/12
21 833	♀, 47	+	3,3	2,9	KA	2	20
7 549	♂, 23	+	3,0	2,7	43 MD	1	28
27 Spender		+	<3,0				

* MD = Grundimmunisierung im Militärdienst ** siehe Erklärung im Text *** KA = keine Angaben erhältlich

Tabelle 2. Ergebnisse des ELISA-Protein-A-Screeningtests

Farb- intensität	Anzahl Seren	Titerhöhe (IE)	Bemerkungen
+++	7	10–46	85% >5 IE
++	22	2,4–45	82% >5 IE
+	33	neg.–20	97% <5 IE
neg.	138	<0,5	

Tabelle 3. Verteilung nach Titerhöhe und Geschlechtern

Titerhöhe	Männer	Frauen	Total
>15 IE	11 (8%)	3 (5%)	14 (7%)
5–15 IE	8 (6%)	2 (3%)	10 (5%)
<5 IE	31 (22%)	7 (12%)	38 (19%)
negativ	89 (64%)	49 (80%)	138 (69%)
Total	139 (100%)	61 (100%)	200 (100%)

Immunisierungstyp wurden die Spender in verschiedene Gruppen eingeteilt: In Gruppe I mit gesicherter Grundimmunisation (auch eine mehrmalige Impfung wird als Grundimmunisation gewertet) und einer Auffrischung während der letzten 2 Jahre konnten in 100% Tetanus-Antikörper nachgewiesen werden, wobei der Antikörpertiter in 90% sehr hoch war. Bei Gruppe II liegt die Revakzination 2–5 Jahre zurück, und es finden sich noch bei rund 20% hohe Antikörpertiter, während bei ca. 30% bereits keine Tetanus-Antikörper-Spiegel mehr nachzuweisen sind. Bei Gruppe III hat die letzte Impfung vor mehr als 5 Jahren stattgefunden; hier finden sich nur noch bei 18% niedrige Antikörpertiter. Ein einziger Spender der Gruppe 3 weist einen hohen Antikörpertiter auf. Offenbar lassen sich in seltenen Fällen auch bei seit Jahren nicht mehr geimpften, aber ursprünglich grundimmunisierten Personen hohe Anti-Tetanus-Titer nachweisen [1]. Gruppe IV schliesslich

Tabelle 4. Zusammenhang zwischen Titerhöhe und Impfanamnese (in Klammern jeweils der Anteil der weiblichen Spender)

Gruppe	Immunisationstyp	Anzahl Seren mit Titerhöhe				Total Seren
		> 15 IE	5–15 IE	< 5 IE	neg.	
I	Grundimmunisation und mindestens 1 Impfung in den letzten 2 Jahren	13 (2) 72%	3 (1) 17%	2 (0) 11%	–	18
II	Grundimmunisation und mindestens 1 Impfung in den letzten 5 Jahren	–	5 (2) 19%	13 (3) 48%	9 (1) 33%	27
III	Grundimmunisation, letzte Impfung mehr als 5 Jahre zurück	–	1 (0) 1%	17 (3) 17%	83 (15) 82%	102
IV	Keine Grundimmunisation	–	–	1 (0) 2%	44 (33) 98%	45

umfasst Personen mit fehlender Grundimmunisation: Hier lassen sich praktisch keine Tetanus-Antikörper-Spiegel nachweisen.

Diskussion

Die beiden von uns verwendeten ELISA-Tests erweisen sich für das Tetanus-Antikörper-Screening grösserer Bevölkerungsgruppen als durchaus geeignet. Der ohne grossen Aufwand durchführbare ELISA-Protein-A-Test ermöglicht ein rasches Erkennen von Personen mit potentiell hohen Tetanus-Antikörper-Titern. Nach Sammlung zusätzlicher Erfahrungen mit diesem Verfahren sollte es ohne weiteres möglich sein, diesen einfachen Test auch für eine exakte Titerbestimmung einzusetzen. Der von uns für die quantitative Tetanus-Antikörper-Bestimmung eingesetzte kompetitive ELISA ist dem RIST in der Empfindlichkeit ebenbürtig und kann von jedem Laboratorium ohne spezielle Einrichtung durchgeführt werden.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass in der Schweiz etwas mehr als 10% der durchschnittlichen Blutspender-Bevölkerung hohe bis sehr hohe Antikörpertiter aufweisen, wobei der Immunisierungsgrad der Männer wahrscheinlich aufgrund der im Militärdienst durchgeführten konsequenten Impfprophylaxe deutlich besser ist als derjenige der Frauen. Es bestätigt sich, dass für den Immunisierungsgrad nebst der Grundimmunisierung offensichtlich der zeitliche Abstand von der letzten Revakzination ausschlaggebend ist [1]. Bei Personen, deren letzte Impfung weniger als 2 Jahre zurückliegt, finden sich in praktisch 100% messbare Tetanus-Antikörper-Titer, nach 2–5 Jahren findet man Antikörper noch bei 60% und nach mehr als 5 Jahren nur noch bei 20%.

Im Vergleich zu den Untersuchungen von ENTWISTLE und ELDRIDGE an englischen Bevölkerungsgruppen [1] zeigen unsere Blutspender eine wesentlich bessere Immunisierung gegen Tetanus. Nicht nur finden sich in der Schweiz durchschnittlich 2mal mehr Tetanusantikörperträger, sondern die gemessenen Ti-

ter sind auch höher, und der Abfall auf minimale Werte dauert länger. Für die Aufrechterhaltung eines sehr hohen Tetanus-Antikörper-Titers ist eine jährliche Wiederimpfung notwendig. Dagegen genügt eine Grundimmunisierung mit Revakzination bei Bedarf (Kontaminationsverdacht) vollständig für eine sichere Prophylaxe.

Von spezifischem und unspezifischem γ -Globulin wird nebst guter Verträglichkeit vor allem eine gute therapeutische Wirksamkeit erwartet. Antitetanus-Hyperimmunglobulin wird für prophylaktische Zwecke heute in einer Dosierung von 250–500 IE verwendet. Für therapeutische Zwecke allerdings sind Dosierungen von 5000–10 000 IE und mehr notwendig. Tetanus-Hyperimmunglobulin-Präparate enthalten normalerweise zwischen 100 und 250 IE Antitoxin pro ml. Die therapeutische intramuskuläre Applikation von 20 und mehr ml Antiserum bietet erhebliche Probleme. In solchen Situationen wäre es wünschbar, dass auf ein gut verträgliches intravenöses Präparat oder auf ein höhertitriges intramuskuläres Präparat ausgewichen werden könnte. Selbstverständlich bieten höhertitrige Präparate auch in prophylaktischer Hinsicht einen besseren Schutz als die herkömmlichen niedrigtitrigen Antisera.

Wie eingangs erwähnt, weist das heute normalerweise benutzte, von frisch immunisierten Rekruten gewonnene Rohplasma durchschnittliche Tetanus-Antitoxin-Titer von 3 IE auf. Bei gezielter Auswahl hochtitriger Spender und allenfalls bei Gewinnung grösserer Plasmamengen von Einzelspendern mittels Plasmapherese wäre es durchaus möglich, für die Fraktionierung ein 10fach potenteres Ausgangsmaterial zur Verfügung zu stellen. Ein solchermassen verbessertes Verfahren würde nicht nur die Qualität des Tetanus-Hyperimmunglobulins heben, sondern hätte wohl auch ein Sinken des durchschnittlichen Preises pro IE zur Folge.

1 Entwistle D. C., Eldridge P. L.: The selection of plasma for the preparation of antitetanus immunoglobulin. Vox Sang. 25, 240–244 (1973).

- 2 Fey H., Stiffler-Rosenberg G.: Messung von Tetanus-Antitoxin beim Pferd mit dem ELISA. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 119, 437–446 (1977).
- 3 Habermann E., Wiegand H.: Rapid and simple radioimmunological procedure for measuring low concentrations of tetanus antibodies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 276, 321–326 (1973).
- 4 Makane P. K., Kawaoi A.: Peroxidase-labeled antibodies. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084–1091 (1974).
- 5 Mesnier F., Piquet Y., Moulinier J.: Triage et dépistages rapides simultanés des anticorps antitétanique et anti-HBs par la technique de Laurell. *Rev. franç. Transf. immuno-hématol.* 20, 593–601 (1977).
- 6 Nelson M.: Automated screening test for high titre tetanus antibodies in donor plasma. *Vox Sang.* 25, 457–460 (1973).
- 7 Sgouris T. J.: The detection and quantitation of diphtheria and tetanus antibodies in human plasma or serum by counterelectrophoresis. *Vox Sang.* 22, 359–361 (1972).
- 8 Stampfli K.: persönliche Mitteilung.
- 9 Stiffler-Rosenberg G., Fey H.: Radioimmunologische Messung von Tetanusantitoxin. *Schweiz. med. Wschr.* 105, 804–810 (1975).
- 10 Stiffler-Rosenberg G., Fey H.: Messung von Tetanus-Antitoxin mit dem ELISA. *Schweiz. med. Wschr.* 107, 1101–1104 (1977).
- 11 Van Ramhorst J. P.: Titration of diphtheria and tetanus antitoxin in sera of low titre. *Bull. WHO* 45, 213–218 (1971).
- 12 WHO: Biological substances: international standard, reference preparations and reference reagents, p. 14/15. WHO, Genf 1972.

Curriculum vitae

- 1955 geboren in Winterthur / ZH
- 1962 - 70 Besuch der Volksschule
in Birmensdorf / ZH
- 1970 Eintritt in das Mathematisch -
naturwissenschaftliche Gymnasium
Rämibühl (ehem. Oberrealschule)
in Zürich
- 1974 Abschluss der Mittelschulbildung
mit dem Eidg. Maturitätsausweis
Typus C
- und im gleichen Herbst Beginn des
Medizinstudiums an der Universität
Zürich
- 1978 / 79 Arbeit über "Tetanusantikörper-
Screening bei Blutspendern" im
Blutspendezentrum Limmattal des SRK
- 1980 Abschluss des Medizinstudiums mit
Absolvierung des Eidg. Staatsexamens

